第 29 卷 第 4 期
1986 年 11 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 29, No. 4
Nov., 1986

棉铃虫蛹期血淋巴的蜕皮甾类

朱湘雄　　陈志辅
（中国科学院上海昆虫研究所）

摘要　目前为止仅在少数几种昆虫中研究过蛹期的蜕皮激素。关于蜕皮甾类的性质分析，结果也颇不一致。本文采用放射免疫分析、薄层层析、高压液相色谱及质谱对棉铃虫 *Heliothis armigera* 蛹血淋巴内的蜕皮激素进行了研究。结果如下：1. 物理-化学方法证明蛹血淋巴内存在二种蜕皮甾类：蜕皮酮和 20-羟基蜕皮酮。2. 蛹期蜕皮甾类滴度呈一宽峰，高峰出现在化蛹后的第 5 天（3435ng/ml）。3. 在高峰时，蜕皮酮与 20-羟基蜕皮酮的比例为 1:3.57，说明 20-羟基蜕皮酮是主要的蜕皮甾类。4. 比较雌雄两性蛹的蜕皮甾类滴度，未见明显差异。研究表明在棉铃虫中影响成虫发育的主要激素是 20-羟基蜕皮酮而不是蜕皮酮。

关键词　棉铃虫　蜕皮甾类　蛹—成虫发育

昆虫的蜕皮过程是由激素控制的。五十年代中期从家蚕蛹的抽提物中分离和结晶了二种具甾体骨架的蜕皮激素，分别称为蜕皮酮和 20-羟基蜕皮酮（Butenandt and Karlson, 1954; Karlson, 1956）。到目前为止在昆虫中已发现具昆虫蜕皮激素骨架的化合物达 10 种以上，现统称为蜕皮甾类（ecdysteroides）。这些化合物，除罗汉松甾酮 A 为 C-28 甾体外，都是 C-27 甾体（Hetru and Horn, 1980）。

为了阐明蜕皮甾类的生理功能，必须了解它们在不同发育时期的性质、组成、动态及来源。以往这方面的研究主要集中于昆虫的幼虫期。越来越多的证据表明，在幼虫期前胸腺一旦活化即开始合成和释放蜕皮酮，蜕皮酮由体液传送到周围组织（如脂肪体和马氏管）并被转化为 20-羟基蜕皮酮（Smith 等，1980）。在蜕皮甾类滴度的高峰时期，20-羟基蜕皮酮是主要的蜕皮甾类。因此一般认为真正的蜕皮激素可能是 20-羟基蜕皮酮，而蜕皮酮是原激素。

蛹期的蜕皮甾类仅在少数几种昆虫中进行过研究，如大菜粉蝶（Lafont 等，1975），家蚕（Calvez, 1976），烟草角蛾（Bollenbacher 等，1981）和美国棉铃虫（Holman and Meola, 1978）。比较这些研究结果，可以发现不同昆虫种类的蜕皮甾类在质与量上都有较大的差异。这些差异究竟是天然存在的还是由于不同的方法学所致，有待进一步阐明。本文报道棉铃虫蛹期的蜕皮甾类，为了避免方法学的片面性，我们采用了放射免疫分析、薄层层析、高压液相色谱和质谱等多种手段。由于棉铃虫是我国的主要农业害虫之一，了解它们的生长发育的内分泌控制，对协调防治也是有意义的。

材 料 与 方 法

材料　棉铃虫 *Heliothis armigera* 以人工饲料饲养在 26℃和 15 小时明，9 小时暗的

本文于 1984 年 12 月收到。
阚秀芳和蒋容静分别协助昆虫饲养和放射免疫测定，谨致谢意。

光周期。人工饲料配方参照乐云仙等 (1978)。幼虫期单管饲养于长 9 厘米，内径 3 厘米的玻璃管中，在此条件下，蛹期历时 12—13 天。

蜕皮甾类的提取和放射免疫分析

蛹的血淋巴用 65% 甲醇水溶液抽提。离心后，沉淀用纯甲醇抽提二次。合并的上清液在减压下蒸干，然后溶于已知量的甲醇中。蜕皮甾类的含量用放射免疫分析法测定，详见朱湘雄 (1984 年) 的方法。样品中蜕皮甾类的含量以 20-羟基蜕皮酮的当量表示。该方法对蜕皮酮和 20-羟基蜕皮酮的灵敏度十分接近。

薄层层析和高压液相色谱

薄层层析使用 20 厘米 × 0.5 毫米的硅胶 (Merke F-254) 板。硅胶板在层析前先用纯甲醇预洗，层析时用氯仿:96% 乙醇 (80:20) 为移动相展开。每次层析时均用蜕皮酮和 20-羟基蜕皮酮标准品作参照。层析后从点样区到溶剂前沿分割成 27 条区带，每带宽度为 0.5 厘米，分别用乙醇抽提各区带的硅胶。然后用放射免疫分析测定乙醇抽提液的蜕皮甾类的含量。

在高压液相色谱的分析中，样品的纯化参照 Lafont 等 (1982) 的方法。血淋巴用水和氯仿 (1:1) 分配，离心后有机相用水重复抽提一次，合并水相。再进一步用 $^{C}18$ Sep Pak 小柱 (Waters and Associates) 分离。在水相抽提液注入 Sep Pak 小柱后，分别用 5 毫升水和 25% 甲醇洗涤，最后用 5 毫升 65% 甲醇洗脱。洗脱液浓缩后即注入 YSB-2 型高压液相色谱仪(附 254 紫外检测仪)。使用反相柱 (YWG RP 18，20 × 0.5 cm 或 Lichrosorb RP 18，15 × 0.5cm) 以 50% 甲醇水为溶液，流速 0.8 毫升/分。在定量分析时，收集各馏分并用放射免疫分析测定。

质谱 将高压液相色谱中与已知蜕皮甾类具相同保留时间和免疫活性的馏分进一步作质谱分析。使用 Finnigin-MAT 4510 型—四极质谱仪，DEP-CI 技术(甲烷为反应气)，质谱在 70 eV 记录。

结 果

血淋巴中蜕皮甾类的滴度

在 12 天蛹期中，每隔 24 小时取一次血样，在甲醇抽提后用放射免疫分析测定蜕皮甾类的含量，结果如图 1 所示。

刚化蛹的个体 (蛹期 0 小时) 即能检出蜕皮甾类 (116ng/ml)。然后蜕皮甾类的滴度逐渐上升，至蛹期第 5 天达到高峰 (3435ng/ml)，第 9 天下降到较低的水平 (78ng/ml)。总的来说，棉铃虫蛹期血淋巴中仅有一个蜕皮甾类的峰，它的持续期几乎占整个蛹期的 2/3，这种趋势与其它昆虫中的情况是一致的 (Dean 等，1980)。虽然在家蚕 (Hanaoka and Ohnishi, 1974) 和大蜡螟 (Bollenbacher 等，1978) 的雌性蛹中都发现过蜕皮甾类的第二个高峰，但是在这一高峰期蜕皮甾类主要积累于卵巢中，血淋巴中的蜕皮甾类仍处于低水平。我们也比较了棉铃虫雌雄二性蛹中血淋巴蜕皮甾类的滴度，结果没有发现任何明显的性别差异。

血淋巴蜕皮甾类的鉴定

由于蛹期血淋巴蜕皮甾类的高峰期出现在化蛹后的第 4 天和第 5 天，因此，这一时期

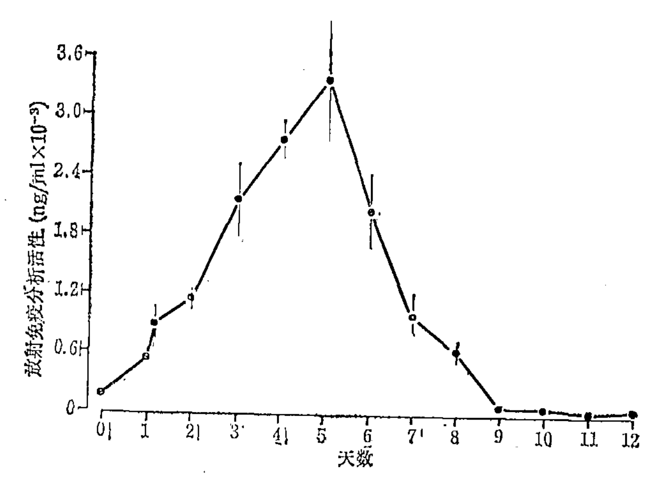


图 1　蛹期血淋巴中蜕皮甾类的滴度

结果以 *ng* 20-羟基蜕皮酮当量表示，每点代表 4—6 次测定的均数±S. E. M.。

蛹的血淋巴用于蜕皮甾类的性质鉴定。首先用薄层层析结合放射免疫分析法分析第 4 天蛹的血淋巴。结果表明，仅仅在 R_f 值相当于 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮的二个区域显示明显的放射免疫活性，而其它区域无明显活性 (图 2)。薄层层析的结果说明血淋巴可能只有二种蜕皮甾类，即 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮。

由于薄层层析往往不能很好分离这二种蜕皮甾类，有时甚至出现重叠现象，我们进行了高压液相色谱分析。图 3 (实线部分)是第 5 天蛹血淋巴蜕皮甾类高压液相色谱分析的

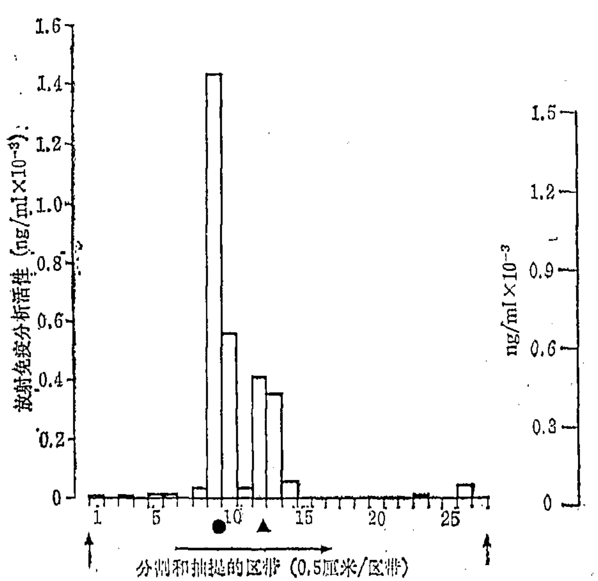


图 2　第 4 天蛹的血淋巴在薄层层析后蜕皮甾类的图象

▲和●分别表示蜕皮酮和 20-羟基蜕皮酮标样的迁移

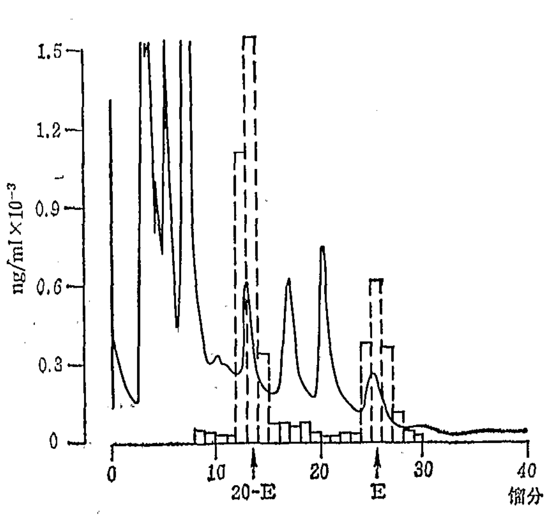


图 3　第 5 天蛹血淋巴蜕皮甾类的高压液相色谱分析

柱：5 毫米内径×20 厘米 YWG-$C_{18}H_{37}$(10μ)，溶剂：MEOH：H_2O (1:1，V/V)，流速一0.8 毫升/分

——血淋巴蜕皮甾类的色谱图

----高压液相色谱后不同馏分的放射免疫分析活性

20-E = 20-羟基蜕皮酮；E = 蜕皮酮

每 0.5 分钟收一馏分，用放射免疫分析测定

一例，进样量相当于 22 微升血淋巴的抽提物。在一些极性很高的馏分之后，有 4 个明显的峰，分别为 P_1，P_2，P_3 和 P_4，其中 P_1 和 P_4 分别与 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮的标样有相同的保留时间（20-羟基蜕皮酮 6.5 分，蜕皮酮 12.6 分）。P_2 和 P_3 是未知化合物。我们用牛膝甾酮（inokosterone）和罗汉松甾酮 A（makisterone A）与 P_2 和 P_3 在同样条件下作了比较，P_2 和 P_3 的极性显然在这二种蜕皮甾类之间。为了检测 P_1—P_4 这 4 个峰以及其它区域是否具有蜕皮甾类的免疫活性，从进样开始收集 40 个馏分（馏分/0.5 分），用放射免疫分析测定蜕皮甾类的含量，结果见图 3（虚线部分）。仅 P_1 和 P_4 具有明显的免疫活性，而 P_2 和 P_3 无活性，因此，P_2 和 P_3 可能不是蜕皮甾类。上述蜕皮甾类的高压液相色谱分析曾用 3 批分别抽提的样品进行了重复，结果有很好的重现性。高压液相色谱分离中收集的 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮的馏分的质谱也与标准样品相符。这些结果清楚说明棉铃虫蛹血淋巴的蜕皮甾类由 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮组成。

蜕皮酮与 20-羟基蜕皮酮的比例

在确定了血淋巴高峰时期含有 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮之后，我们比较了化蛹后初期及蛹龄第 5 天血淋巴中这二种蜕皮甾类的比例。血淋巴抽提物用液谱分离后，收集 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮的馏分，然后用放射免疫分析测定，结果列于表 1。在蛹龄第 1 天，蜕皮酮的量大于 20-羟基蜕皮酮，但是在蛹龄第 5 天，即蜕皮甾类的滴度高峰时，20-羟基蜕皮酮成为主要的蜕皮甾类（占 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮总量的 78%）。这一结果提示 20-羟基蜕皮酮是影响成虫发育的主要因子。

表 1 棉铃虫蛹 成虫发育期不同阶段血淋巴中蜕皮酮与 20-羟基蜕皮酮的比例

蛹 龄	分析次数	蜕皮酮:20-羟基蜕皮酮	
第 1 天	3	1	0.68
第 5 天	3	1	3.57

讨 论

用放射免疫分析、薄层层析和高压液相色谱证实棉铃虫蛹含有 20-羟基蜕皮酮和蜕皮酮。这一结果与其它鳞翅目昆虫中的报道相似，如烟草角蛾（Bollenbacher 等，1981）、大菜粉蝶（Lafont 等，1975）、美国棉铃虫（Holman and Meola, 1978）和银纹夜蛾（朱湘雄，1984）。但是，如果我们比较成虫发育期蜕皮酮与 20-羟基蜕皮酮的比例，我们马上就会发现在这些鳞翅类昆虫之间存在着很大的差异。在烟草角蛾中（Bollenbacher 等，1981），从幼虫期到成虫期蜕皮酮在蜕皮甾类中所占的比例逐渐增加，而在蛹血淋巴中蜕皮甾类的高峰期蜕皮酮是主要的蜕皮甾类。在家蚕的这个高峰期仅发现蜕皮酮（Calvez,1976）。因此，这些作者认为蜕皮酮在这一时期可能具有激素的功能。相反，我们证实在棉铃虫 *Heliothis armigera* 蛹蜕皮甾类的高峰时 20-羟基蜕皮酮是主要的蜕皮甾类。同样情况可能也存在于美国棉铃虫 *H. zea*（Holman and Meola, 1978）和大菜粉蝶（Lafont 等，1975）中。

前胸腺是蜕皮酮的来源已在一些昆虫的幼虫期得到证实，如家蚕（Chino 等，1974）和烟草角蛾（King 等，1974）。但是蛹期的情况还不是十分清楚，通过切除美国棉铃虫

蛹的前胸腺曾证明该腺体是蛹期蜕皮甾类的来源 (Meola and Adkisson, 1977)。我们发现棉铃虫第 1 天蛹的前胸腺能在体外温育的条件下产生具蜕皮甾类免疫活性的物质，在蛹期的第 3—4 天前胸腺发生组织分解 (未发表资料)。由于蜕皮甾类的最大滴度出现在蛹期第 5 天，因此，在蛹的早期由前胸腺产生的蜕皮甾类可能有部分以某种形式(例如与大分子结合或形成蜕皮甾类的结合物)保存在血淋巴中，而在蜕皮甾类的高峰期被重新活化。在棉铃虫的预成虫期，蜕皮甾类的滴度下降可能是由于蜕皮甾类的分解所致，例如，在烟草角蛾的蛹便中曾发现多种失活的蜕皮甾类，如 3-表-蜕皮酮，3-表-20-羟基蜕皮酮和蜕皮甾类结合物 (Kaplanis 等，1980)。

参　考　文　献

乐云仙等 1978 棉铃虫核型多角体病毒病的研究 (I)——病症和病原物。复旦大学学报，74—85 页。

朱湘雄 1984 银纹夜蛾幼虫期和蛹期蜕皮甾类的滴度和组成。昆虫学研究集刊，第四集，65—9 页。上海科学技术出版社。

Bollenbacher, W. E. et al. 1981 Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44: 302—6.

Bollenbacher, W. E. et al. 1978 Changes in ecdysone content during postembryonic development of the wax moth, *Galleria mellonella*: the role of the ovary. *Gen. Comp. Endocrinol.* **34**: 169—79.

Butenandt, A. & Karlson, P. 1954 Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormones der Insekten in kristallisierten Form. *Z. Naturf.* 96: 389—91.

Calvez, B. 1976 Ecdysone changes in the haemolymph of two silkworms (*Bombyx mori* and *Philosamia cynthia*) during larval and pupal development. FEBS Letters, 71: 57—61.

Chino, H. et al. 1974 Biosynthesis of α-ecdysone by prothoracic glands in vitro. *Science* **183**: 529—30.

Dean, R. L. et al. 1980 Haemolymph ecdysteroid level and cellular events in the intermoult/moult sequence of Calpodes. *J. Insect Physiol.*, 26: 267—80.

Hanaoka, J. A. & Ohnishi, E. 1974 Changes in ecdysone titer during pupaladult development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 20: 2375—84.

Hetru, C. & Horn, D. H. S. 1980 Phytoecdysteroids and zooecdysteroids. In: Progress in Ecdysone Research (ed. J. A. Hoffmann), pp. 13—18. Elsevier/North-Holland.

Holman, G. M. & Meola, R. W. 1978 A high-performance liquid chromatography method for the purification analysis of insect ecdysones: Application to measurement of ecdysone titers during pupal-adult development of *Heliothis zea*. *Insect Biochem.*, 8: 275—8.

Kaplanis, J. N. et al. 1980 Moulting hormones of the tobacco hornworm and milkweed bug: their chemistry and biochemistry. In: Progress in Ecdysone Research (ed. J. A. Hoffmann), pp. 163—86. Elsevier/North-Holland.

Karlson, P. 1956 Biochemical studies on insect hormones. *Vitamins and Hormones* 14: 227—66.

King, D. S. et al. 1974 The secretion of α-ecdysone by the prothoracic glands of *Manduca sexta* in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA **71**: 793—6.

Lafont, R. et al. 1975 α-and β-ecdysone levels in insect haemolymph: correlation with developmental events. *Experientia* 31: 1241—42.

Lafont, R. et al. 1982 Sample processing for high-performance liquid chromatography of ecdysteroids. *J. Chromat.* 236: 137—49.

Meola, R. W. & Adkisson, P. L. 1977 Release of prothoracicotropic hormone and potentiation of development ability during diapause in the bollworm, *Heliothis zea*. *J. Insect Physiol.*, **23**: 683—8.

Smith, S. L. et al. 1980 Studies on the biosynthesis of ecdysone and 20-hydroxyecdysone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. In: Progress in Ecdysone Research (ed. J. A. Hoffmann), pp. 139—62. Elsevier/North-Holland.

ECDYSTEROIDS IN HEMOLYMPH OF COTTON BOLLWORM *HELIOTHIS ARMIGERA* (HÜBNER) DURING PUPAL STAGE

ZHU XIANG-XIONG CHEN ZHI-FU

(*Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica*)

The ecdysteroids in the haemolymph of *Heliothis armigera* pupae were studied by radioimmunoassay, thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography and mass spectrometry. The results are as follows:

1. Two ecdysteroids, ecdysone and 20-hydroxyecdysone, are present in pupal haemolymph.

2. The ecdysteroid titer in the pupal stage shows a single broad peak and the high peak appears on the fifth day after pupation (3435 ng/ml).

3. For the high peak, the ratio of ecdysone to 20-hydroxyecdysone is 1:3.57, indicating that 20-hydroxyecdysone is the predominant ecdysteroid.

4. Comparison between the haemolymph ecdysteroid titers of both male and female pupae shows no obvious difference.

The results suggest that 20-hydroxyecdysone, but not ecdysone, is the major moulting hormone responsible for adult development in *H. armigera*.

Key words *Heliothis armigera*——ecdysteroids——pupal-adult development